

19/37,DE/65

(Item 65 from file: 351)

008854286 WPI Acc No: 91-358307/49

XRAM Acc No: C91-154509

XRPX Acc No: N91-274391

New MAB used as diagnostic agent in immunoassay - has high specificity for C-@ERB@ @B@-2 prod. on the extracellular surface, useful for distinguishing cancer cells; MONOCLONAL ANTIBODY

Index Terms: NEW DIAGNOSE AGENT IMMUNOASSAY; HIGH SPECIFIC PRODUCT EXTRACELLULAR SURFACE USEFUL DISTINGUISH CANCER CELL

Patent Assignee: (IWAS) IWASAKI ELEC KK; (ASAG) ASAHI GLASS KK

Number of Patents: 001

Number of Countries: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Week	Applic No	Date	LA	Pages	IPC
JP 3240498	A	911025	9149	JP 9033977	900216			

(B)

Priority Data (CC No Date): JP 9033977 (900216)

Abstract (Basic): JP 3240498

Monoclonal antibody is prepd. using an antigen a partial peptide of the extracellular hydrophilic portion in the protein aminoacid sequence of c-@erb@ @B@-2 prod., the antigen being pref. a peptide of the aminoacid sequence.

His-Thr-Ala-Asn-Arg- Pro-Glu-Asp-Glu-Cys-Val-Gly-Glu-Gly-Leu

Also claimed is a method for the immunoassay using the monoclonal antibody, pref. for distinguishing cancer cells.

USE/ADVANTAGE - The monoclonal antibody is high in specificity for c-@erb@ @B@-2 product and can recognise the site where c-@erb@ @B@-2 prod. is present on the extracellular surface. Has excellent feature as an image diagnosis agent by immunostaining. @ (4pp Dwg.No.0/0)@

erwent Class: @B04@; @D16@; S03; R16;

nt Pat Class: @C12N-005/20@; @C12N-015/06@; @C12P-021/08@; @C12R-001/91@; @G01N-033/57@

⑫ 公開特許公報(A) 平3-240498

⑤Int. Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 ④公開 平成3年(1991)10月25日
 C 12 P 21/08 8214-4B
 // C 12 N 5/20
 15/06
 G 01 N 33/574 D. 9015-2G
 33/577 B 9015-2G
 (C 12 P 21/08
 C 12 R 1:91)
 7236-4B C 12 N 5/00 B
 8717-4B 15/00 C
 審査請求 未請求 請求項の数 4 (全4頁)

④発明の名称 抗体およびそれを使用した免疫分析方法

②特 願 平2-33977

②出 願 平2(1990)2月16日

特許法第30条第1項適用 平成元年10月22日、腫瘍マーカー研究会発行の「第9回腫瘍マーカー研究会プログラム抄録集」に発表

②発 明 者 清 水 信 義 埼玉県朝霞市朝志が丘1丁目2番地
 ①出 願 人 清 水 信 義 埼玉県朝霞市朝志ヶ丘1丁目2番地
 ①出 願 人 岩崎電気株式会社 東京都港区芝3丁目12番4号
 ①出 願 人 旭硝子株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目1番2号
 ④代 理 人 弁理士 内 田 明 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

抗体およびそれを使用した免疫分析方法

2. 特許請求の範囲

1. c-erbB-2産物の蛋白質アミノ酸配列中の細胞外親水部位の部分ペプチドを抗原として得られたモノクローナル抗体。
2. 抗原が下記アミノ酸配列のペプチドである、請求項第1項記載のモノクローナル抗体。
His-Thr-Ala-Asn-Arg-Pro-Glu-Asp-Glu-Cys-Val-Gly-Glu-Gly-Leu
3. 請求項第1項記載のモノクローナル抗体を使用して免疫分析を行うことを特徴とする免疫分析方法。
4. 癌細胞を識別する、請求項第3項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、肺癌の癌化と密接に関係して発現

すると予想されるヒト癌遺伝子c-erbB-2産物に特異的なモノクローナル抗体およびそれを用いた免疫分析方法に関するものであり、当該抗体を放射性同位元素、蛍光色素、酵素などで標識し、肺癌の病巣部位や転移の診断を行なう診断薬として用いることができる。特に本抗体の特徴を生かし画像診断薬として有用である。さらに、この抗体は、イムノトキシンとしても応用されることが期待される。

〔従来技術、発明が解決しようとする課題〕

肺癌の診断法としては、超音波によるものや、金コロイドあるいはテクネシウム放射性同位元素の血中投与によるもの等があるが、前者は癌腫瘍とリンパ部の腫れ等の区別ができず、後者は単に血管分布を調べているため癌腫瘍と血管部位との区別ができない。すなわち、これらの方法は癌腫瘍に対する特異性の面で欠点がある。一方、癌組織を特異的に識別し得るものとして抗体が上げられ、肺癌の画像診断薬としては、治験中ではあるが、CEAを抗原としたも

のがある。現在、本発明に類似するc-erbB-2産物に対する抗体作製の報告が数例あるが、そのほとんどは細胞内のリン酸化部位と反応するものであり、生体での癌組織の認識はできない。下記本発明の抗体は、細胞外の部位と反応し、さらに癌組織の免疫染色が可能であり、画像診断薬として利用できる抗体としては他に例がない。

〔課題を解決するための手段〕

癌組織を効果的に識別し得る抗体を得るために、いろいろな腺癌組織において増幅されている癌遺伝子c-erbB-2に着目した。c-erbB-2は、特に乳癌組織あるいは胃癌組織において増幅されていることが知られている。従って、c-erbB-2の発現とこれらの癌の癌化には、密接な関係があるものと考えられる。また、c-erbB-2の産物は、分子量185kDaの膜貫通性の蛋白質であることが知られているので、細胞外部に貫通したc-erbB-2の産物の部位を認識する抗体を見出すことにより、非常に有益な抗体が

得られると予想される。

そこで、c-erbB-2産物の蛋白質アミノ酸配列の中で、細胞外の部分に相当する親水性部位のペプチドをいくつか合成し、それを抗原として得た抗体を評価した。

即ち、後述第1表記載のアミノ酸残基数約10～20の親水性ペプチドを合成し、それを抗原として通例の方法によりポリクローナル抗体を得、それを用いて癌細胞の免疫分析を行った。その結果、いずれも反応性に差異のあるものの癌細胞を特異的に認識しうる抗体であることがわかった。

そこで本発明者は、さらに抗体の特異性を高めるために上記抗原を用いてモノクローナル抗体を作成し、それを評価した。その結果、特異性が極めて高いモノクローナル抗体を得ることができた。

本発明は、上記モノクローナル抗体およびそれを使用した免疫分析方法に係る発明である。

本発明において、抗原のペプチドとしては、

3

後述第1表5に記載のペプチドが最も好ましい。しかし、これに限られるものではなく、第1表1. および2. に記載のペプチドも好ましいペプチドである。また、抗原は通常キャリア蛋白質に結合させて抗体製造に用いられる。

なお、本発明におけるモノクローナル抗体は後述実施例に示すように、公知のモノクローナル抗体製造法で製造することができるものである。

参考例

c-erbB-2癌遺伝子によってコードされた産物の親水性部位をChou-Fasmanの方法を用いて検索し、それらのいくつかについて、その合成ペプチドを作成し、キャリア蛋白質に結合し、それを抗原としてマウスを免疫した。得られた抗血清について、c-erbB-2の発現が認識されている乳癌細胞株SK-BR-IIIに対する反応性を、細胞を固相化したELISA法で調べ、第1表の結果を得た。

5

4

この結果から、第1表の5の成分ペプチドが最も有効であることが見出された。

第1表 親水性部位のペプチドと反応性

	免 疫 ペ プ チ ド	N 端 残 基	反 応 性
1	His-Asn-Gln-Glu-Val-Thr-Ala-Glu-Asp-Gly-Thr-Gln-Arg-Cys-Glu-Lys	318 ~ 333	++
2	Thr-Leu-Ile-Asp-Thr-Asn-Arg-Ser-Arg-Ala	182 ~ 191	++
3	Leu-Arg-Ser-Leu-Arg-Glu-Leu-Gly-Leu-Ala	455 ~ 466	+
4	Tyr-Met-Pro-Ile-Trp-Lys-Phe-Pro-Asp-Glu-Glu-Gly-Ala	610 ~ 622	+
5	His-Thr-Ala-Asn-Arg-Pro-Glu-Asp-Glu-Cys-Val-Gly-Glu-Gly-Leu	495 ~ 509	+++++

実施例

c-erbB-2癌遺伝子によってコードされた産物のN端495 から509 までの残基のペプチド（上記第1表5の合成ペプチド）を抗原とし、それにより免疫したマウス脾細胞と、マウス骨

髓腫細胞 (SP2/0) を細胞融合させ、ハイブリドーマを作製することにより得られる。作製手順の概要は以下である。

抗原ペプチドは、アミノ酸配列が HTANRPEDEC VGEGL である合成ペプチドと、キャリアー蛋白質として、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) をグルタルアルデヒドを用いて架橋させて作製した。作製の方法は、G. Walter 等の方法 (Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 6197, 1980) に準じた。次に、免疫は、上記を抗原とし Balb/c マウスを用いた。また、細胞融合は、Behzadian, M. A. 等の方法 (Cell Struct. Funct., 10, 219, 1985) に準じて行なった。スクリーニングは ELISA 法を用いた。

得られたモノクローナル抗体はヒト c-erbB-2 産物を認識する。なお、このモノクローナル抗体が、c-erbB-2 産物に対するものであるか否かは、c-erbB-2 の発現が確認されている乳癌細胞株 SK-BR-III の蛋白質を ^{35}S -methionine で放射標識したものを可溶化し免疫沈澱を行ない、

7

としては OPD である。

(3) 細胞融合

免疫された Balb/c マウスの脾臓を摘出し、RPMI 1640 培地中で脾細胞を押し出す。マウス骨髓腫細胞 SP2/0 を脾細胞数の 1/5 ~ 1/10 量に加え、RPMI を遠心で除いた後、ポリエチレングリコール (分子量 4000, シグマ) で細胞融合を行なった。ポリエチレングリコールの排除、融合の確実性を得るために、直ちに遠心を行ない、HAT 培地にて培養した。約一週間後血清培地にて限界希釈法にてクローニングを行なった。スクリーニングは ELISA 法にて行なった。

(4) モノクローナル抗体の調製

得られたハイブリドーマを、15% FCS、グルタミン酸、インシュリンを含んだ RPMI 1640 培地で増殖し、X 線処理、プリスタン投与した Balb/c マウスの腹腔内に細胞 (10^7 / 匹) を投与する。約 3 週間後、腹水を取り遠心分離を行ない、上清から DEAE セルロースカラムを用いて抗体を精製した。

SDS 電気泳動法で展開後、そのオートラジオグラフィーを分析することにより、確認された。

I. モノクローナル抗体の製造

(1) 抗原蛋白質の調製

前記ペプチドの合成は、自動ペプチド合成装置による固相法で行なった。さらに、1 mg KLH と 3 mg ペプチドを 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で、2.5 % グルタルアルデヒドで架橋反応を行なった。さらに、フリーのグルタルアルデヒドを除くために、0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) + 0.15 M NaCl 中で透析を行なった。

(2) 免疫

100 μg 抗原蛋白質とフロインド不完全アジュバンドを、Balb/c マウスの皮下に 14 日間隔で 3 回投与した。ペプチドに対する抗血清が得られているか否かは、ペプチドを 96 穴プレートに固定し ELISA 法で調べた。この時、抗マウス IgG に酵素 POX を接合したものをを用いた。基質

8

II. c-erbB-2 産物に対するモノクローナル抗体の性質

(1) 抗体のサブクラスの固定

Ouchterlony 法に準じて行なった。抗マウス IgM 又は抗マウス IgG と、得られたモノクローナル抗体を 1 % 寒天中で反応させ、沈降線を生ずるか否かで調べた結果、モノクローナル抗体は IgM と確認された。

(2) 分子量

セファクリル S-300 superfine を用いてカラムクロマトグラフィーで調べた。

(3) 抗体の免疫特性

^{35}S -methionine で蛋白質を放射標識した SK-BR-III 細胞を可溶化し、それにモノクローナル抗体を加え反応させ、遠心による沈澱物の数回の洗浄後、SDS 電気泳動 (7.5 %) で展開し、そのゲルのオートラジオグラフィーを取ったところ、185 kDa 付近に一本のバンドが観察された。この分子量はヒト c-erbB-2 産物と同じであり、この抗体が c-erbB-2 産物を認識してい

ることがわかる。

乳癌組織を採取後、直ちにO.C.T.compoundに包埋凍結し、新鮮凍結切片を作成し、ABC法にて免疫染色を行なった。その結果癌包巣の細胞は良く染色されたが、それ以外の部分では染色性が認められなかった。

ここで、免疫原である合成ペプチドで抗体と競合させると、癌組織はほとんど染色されなかった。また、15残基からなる任意の合成ペプチドを加えても、染色性には影響なく、この抗体の代りにノーマル抗体で処理すると、全く染色されなかった。

以上のことは、このモノクローナル抗体が画像診断薬として利用できることを示している。

〔発明の効果〕

本発明のモノクローナル抗体は、c-erbB-2産物に対する特異性が高く、しかもc-erbB-2産物の細胞外表面に存在する部位を認識する抗体である。従って、本発明の抗体は生体組織中の

c-erbB-2産物を発現した癌細胞を他の細胞から区別して認識することができ、免疫染色による画像診断薬として優れた特性を有する。

代理人	内	田	明
代理人	萩	原	亮
代理人	安	西	篤
			夫